

88-240645

B3

Ostrooibaad



Nederland

⑫ A Terinzagelegging ⑪ 8700089

⑯ NL

YACE 203/204

B

⑯ Therapeutische toepassing van dideoxythymidine en
dideoxythymidineen.

⑯ Int.CI.: A61K31/70, C07D 405/04.

⑯ Aanvrager: Stichting Rega V.Z.W. te Leuven, België.

⑯ Gem.: Ir. R. Hoijtink c.s.
Ostrooibureau Arnold & Siedsma
Sweelinckplein 1
2517 GK 's-Gravenhage.

MEDICAMENTS FOR TREATING AIDS + CONTG.
2',3'-DI:DEOXY-THYMIDINE OR 2',3'-DI:DEOXY-
THYMIDINENE

⑯ Aanvraag Nr. 8700089.

⑯ Ingediend 15 januari 1987.

⑯ ..

⑯ ..

⑯ ..

⑯ ..

⑯ ..

⑯ Ter inzage gelegd 1 augustus 1988.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

1485

88240645

De uitvinding betreft een nieuw therapeutisch middel voor het behandelen van AIDS en verwante ziekten, en ook op de bereiding en toepassing daarvan.

AIDS of verworven immunodeficiëntiesyndroom is een pandemische ziekte gekenmerkt door een grote gevoeligheid voor ongebruikelijke maligniteiten en verzwakking van het immuunsysteem, gepaard gaande met levensgevaarlijke infecties. De veroorzaker van AIDS is geïdentificeerd als een retrovirus, genaamd HTLV-III/LAV oftewel "human T-cell lymphotropic virus type III/lymphademosopathy-associated virus".

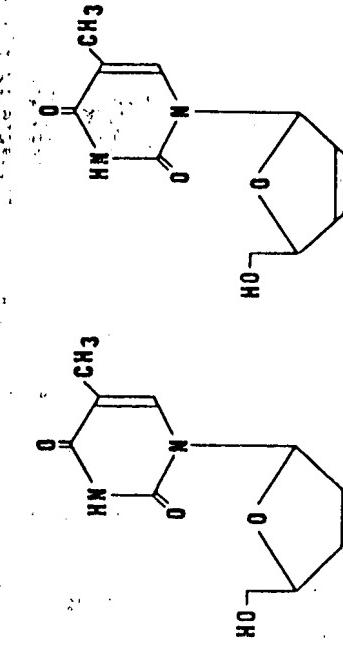
In de huidige beschrijving zal dit retrovirus HIV of humaan immunodeficiëntievirus worden genoemd, zoals voorgesteld in Science, 232, 1486 (1986). Onlangs zijn ook enkele andere virussen beschreven, die verwant zijn aan HIV en die aan AIDS verwante ziekten of ziektestoestanden veroorzaken.

Het is reeds bekend dat 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (azidothymidine, AZT, N₃ddT) één krachtige inhibitor van de HIV-replicatie in lymphocyt-culturen is en dat het de cellen tegen het cytopathogene effect van dat virus zal beschermen bij een concentratie van 5-10 μ M (Mitsuya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 7095-7100 (1985)). Verder is het bekend dat 2',3'-dideoxyribosyl-derivaten van purinen (adenine, guanine, hypoxanthine) en pyrimidinen (thymine en cytosine) de door HIV opgewekte cytopathogenicitate in vitro significant onderdrukken. Het meest krachtige derivaat van deze reeks is 2',3'-dideoxyctydine dat reeds een volledige antivirale bescherming zal leveren bij een lage concentratie van 0,5-1,0 μ M (Mitsuya et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 83, 1911-1915 (1986)). Bovendien is onlangs gevonden dat een onverzadigd derivaat van 2',3'-dideoxycytidine, namelijk 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyctydine of 2',3'-dideoxyctydineen, evenals 2',3'-dideoxyctydine zelf een krachtige en selectieve inhibitor van HIV in vitro is (Balzarini et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 140, 735-742, (1986)).

Naast deze bekende materie bestaat behoefté aan andere stoffen die als potentiële HIV-inhibitoren werken. De uitvinding heeft dan ook als primair oogmerk zulke inhibitoren te leveren, evenals therapeutische preparaten die deze inhibitoren bevatten.

In overeenstemming met de uitvinding is nu gevonden, dat 2',3'-dideoxythymidine en een onverzadigd derivaat daarvan namelijk 2',3'-dideoxythymidineen, eveneens krachtige en selectieve anti-HIV-middelen zijn. Hun selectiviteit en potentie is vergelijkbaar met die van 2',3'-dideoxyctydine en daardoor kunnen zij met voordeel worden gebruikt in farmaceutische preparaten die bestemd zijn voor het behandelen van AIDS-patiënten. Een potentieel gebruik tegen ziekten, veroorzaakt door aan HIV verwante virussen valt eveneens binnen het kader van de uitvinding.

2',3'-dideoxythymidine (ddT) en 2',3'-dideoxythymidineen (ddethd) kunnen worden weergegeven door de volgende chemische formules I en II:



ddT
ddethd

I
II

P.C.U.089 88240645

1486

88240645

1487

Beide stoffen werden reeds in de jaren 1960 door Horwitz et al. gesynthetiseerd (vergl. J. Org. Chem., 32, 817-818 (1967) en Tetrahedron Letters, 1964, 2725-2727 en 1966, 1343-1346). Daarom vormen de verbindingen als zodanig en hun chemische synthese geen deel van de huidige uitvinding.

In hun werking als anti-HIV middelen vertonen 2',3'-dideoxythymidine en 2',3'-dideoxythymidine een selectiviteit en een potentie die vergelijkbaar zijn met die van 10 2',3'-dideoxycytidine. Beide stoffen zijn echter minder krachtige HIV-inhibitoren dan azidothymidine. Bij onderling vergelijking blijkt 2',3'-dideoxythymidine een krachtiger werking en 2',3'-dideoxythymidine een meer selectieve werking te hebben. De selectieve werking van 2',3'-dideoxythymidine is zelfs vrijwel gelijk aan die van azidothymidine. Het onverzadigde derivaat, 2',3'-dideoxythymidineen is giftiger voor niet-infectorde gattheercellen dan het verzadigde derivaat 2',3'-dideoxycytidine. Niettemin bleek bijparallele proeven dat de selectiviteitsindex van 2',3'-dideoxythymidineen slechts weinig minder was dan die van 20 2',3'-dideoxyctidine.

Opgemerkt wordt dat de anti-HIV werking van 2',3'-dideoxythymidine reeds eerder is getest zonder dat daaruit een krachtige werking bleek (vergl. Mitsuya et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 83, 1911-1915 (1986)). Volgens deze publicatie werd de cytopathogene werking van HIV in AT88-cellen volledig door 2',3'-dideoxycytidine en 2',3'-dideoxythymidine geremd bij een concentratie van respectievelijk 0,5 μ M en 20 μ M. Daarentegen bleek bij proeven die tot de 25 huidige uitvinding leidden, dat dezelfde stoffen in MT-4 cellen een volledige bescherming tegen HIV leveren bij een concentratie van respectievelijk 0,2 μ M en 1 μ M. In tegenstelling tot de genoemde literatuur blijkt 2',3'-dideoxythymidine derhalve wel goede vooruitzichten als anti-HIV-middel te bieden.

Therapeutische preparaten die 2',3'-dideoxythymidine of 2',3'-dideoxythymidineen als werkzaam bestand-

deel voor het behandelen van AIDS in de humane praktijk bevatten, kunnen de worm hebben van poeders, suspensies, oplossingen, sprays, emulsies, zalfen of crèmes en kunnen worden gebruikt voor lokale toediening, voor intranasale, rectale, 5 vaginale en ook voor orale of parenterale (intraveineuse, intradermale, intramusculaire, intrathecale etc.) toediening. Dergelijke preparaten kunnen worden bereid door de actieve stof van formule (I) of (II) te combineren (bijvoorbeeld door mengen, oplossen etc.) met farmaceutisch aanvarendbare excipientia van neutrale aard (zoals waterige of niet-waterige oplosmiddelen, stabilisatoren, emulgatoren, detergentia, additieven), en verder desgewenst met kleur- en geurstoffen. De concentratie van het actieve bestanddeel in het therapeutische preparaat kan sterk variëren tussen 0,1% en 15 100%, afhankelijk van de wijze van toediening. Verder kan de dosis van het toe te dienen actieve bestanddeel variëren tussen 0,1 mg en 100 mg per kg. lichaamsge wicht.

De anti-HIV-eigenschappen van 2',3'-dideoxythymidine en 2',3'-dideoxythymidineen worden gedocumenteerd door de volgende voorbeelden die niet in beperkende zin dienen te worden gelezen. Verschillende andere 2',3'-dideoxy nucleosiden en hun 2',3'-onverzadigde derivaten worden daarin voor vergelijkingsoeleinden gebruikt.

In de voorbeelden wordt herhaaldelijk verwezen naar 20 de bijgaande tekeningen, waarin:

25 fig. 1 een grafische voorstelling is van de testresultaten over de remming van het cytopathogene effect van HIV in MT-4 cellen door diverse 2',3'-dideoxy nucleosiden en hun 2',3'-onverzadigde derivaten,

fig. 2 een grafische voorstelling is van de testresultaten over de remming van de virusantigen-expressie in 30 door HIV geïnfecteerde MT-4 cellen door dezelfde reeks 2',3'-dideoxy nucleosiden en hun 2',3'-onverzadigde derivaten.

In de voorbeelden en de tekeningen worden de volgende afkortingen gebruikt:

39 88240645
1488 1489 88240645
88240645

HIV - humaan immunodeficiëntie virus, zoals oorspronkelijk afgeleid uit een "pool" van AIDS-patiënten;

ddAdo - 2',3'-dideoxyadenosine;

ddThd - 2',3'-dideoxythymidine;

ddCyd - 2',3'-dideoxycytidine;

ddUrd - 2',3'-dideoxyuridine;

ddeAdo - 2',3'-dideoxyadenosineen;

ddeThd - 2',3'-dideoxythymidineen;

ddeCyd - 2',3'-dideoxycytidineen;

ddeUrd - 2',3'-dideoxyuridineen;

MT-4 cellen - cellen van een humane T4-lymfocyt en cellen die HTLV-I draagt (vergl. Harada et al., Science, 229, 563-566 (1985));

HTLV-I - Type I van het humane T-cel lymphotroop virus; een kweekmedium voor celculturen ontwikkeld in het Roswell Park Memorial Institution en geleverd door Gibco, Grand Island, N.Y., U.S.A.

Het bevat anorganische zouten (NaCl, NaHCO₃, Na₂HPO₄, etc.), glucose, diverse aminozuren en diverse vitamines;

de virusdosis voldoende om 50% van de cultuur te infecteren.

Wat de chemische verbindingen betreft, werden ddCyd en ddUrd verkregen van Pharmacia, en werden ddAdo en ddThd verkregen van Calbiochem-Behring. De onverzadigde derivaten werden gesynthetiseerd door een 2'-deoxy-3',5'-epoxy-nucleoside te laten reageren met kalium t-butanolaat in dimethylsulfoxide volgens de methode van Horwitz et al. (J. Org. Chem., 32, 817-818 (1967)). De spectraaldata waren consistent met die weke eerder werden gepubliceerd.

Bet HIV werd verkregen van het National Cancer Institute, Bethesda, Md, U.S.A., waar het werd geoogst uit de cultuurvoeistof van HIV-producerende H9 cellen, zoals beschreven door Popovic et al. in Science 224, 497-500 (1984). Dit virus werd bewaard bij -70°C, totdat het gebruikt werd. De titer van het virus, uitgedrukt in CCID50, was vooraf bepaald.

De MT-4 cellen waren verkregen bij het Institut Pasteur te Parijs, Frankrijk.

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000

Voorbeeld 1

Remming van het cytopathogene effect van HIV.

Een viertal 2',3'-dideoxynucleosiden en hun 2',3'-onverzadigde derivaten werden met elkaar vergeleken aangaande hun remmende werking op het cytopathogene effect van HIV in MT-4 cellen. De methode is beschreven door Mitsuya et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 7076-7100 (1985).

De MT-4 cellen werden ingesteld op een concentratie van 5 x 10⁵ cellen/ml. met behulp van RPMI-1640 medium, ge-supplementeerd met 10% foetaal kalverserum en antibiotica, waarna porties van 2 ml. van de celuspensusie werden geïnfecteerd met 200µl van de virusvoeistof (titer: 103,8 CCID50/ ml.; eindtiter: 300 CCID50/holte). Voor de controleproeven werden MT-4 cellen quasi-geïnfecteerd met 200µl celkweekmedium. De cellen werden bij 37°C geïncubeerd. Na 90 minuten incubatie werd 1,8 ml kweekmedium aan elke portie van de cel-suspensie toegevoegd. In de holtes van een microtiterplaat van kunststof werden vooraf diverse verdunningen (telkens 100µl) van de te bespoeden verbindingen in celkweekmedium be-reid. Daarna werd 100ml van de met HIV geïnfecteerde of de quasi-geïnfecteerde celuspensusie aan elke holte toegevoegd en werden de celcultuuren bij 37°C geïncubeerd. Na 5 dagen werd de levensvatbaarheid van de cellen microscopisch vastgesteld in een hemacytometer met behulp van de trypanblauw-exclusiemethode.

De resultaten van de proef met MT-4 cellen zijn weergegeven in fig. 1 van de tekening, waarin het aantal levensvatbare cellen na 5 dagen is uitgezet tegen de concentratie van de te bespoeden verbindingen. De zwarte kolommen hebben betrekking op proeven met door HIV geïnfecteerde cel-len, terwijl de witte kolommen betrekking hebben op proeven met quasi-geïnfecteerde cellen.

Uit fig. 1 blijkt dat ddeThd het meest krachtig was bij het beschermen van de cellen tegen vernietiging door het

1491 1490 88240645

1491 1490 88240645

1491 1490 88240645

virus. Bij $0,04 \mu\text{M}$ beschermde ddCyD de MT-4 cellen volledig terwijl de op één na krachtigste verbinding, ddCyD een concentratie van $0,2 \mu\text{M}$ nodig had om een volledige bescherming te geven. De stof ddCyD leverde circa 45% bescherming bij $0,008 \mu\text{M}$, bij welke concentratie ddCyD totaal geen remmende werking had.

Met dit gedrag werd een volledige bescherming tegen de ziektevervoerders bereikt bij een concentratie van 100%.

cyclopentenogende verbinding van $1 \mu\text{M}$. De stof ddeCyd beschermde de cellen eveneens tegen HIV bij een concentratie van $1 \mu\text{M}$. De andere verbindingen waren minder krachtig in hun anti-HIV werking, aangezien ddkdo een volledige bescherming pas leverde bij $25 \mu\text{M}$, en ddurd een bescherming van 80% leverde bij $125 \mu\text{M}$, terwijl ddeAdo en ddeUrd praktisch geen beschermende werking vertoonden.

Uit fig. 1 (de witte kolommen) blijkt verder dat de testverbindingen bij hogere concentratie cytotoxisch gaan werken en dat de verbindingen in dit opzicht grote verschillen vertonen. Zo remde ddeUrd het aantal levensvatbare cellen met 45% bij een concentratie van $1 \mu\text{M}$, terwijl ddcyd het aantal levensvatbare cellen met 25% verminderde bij een concentratie van $1 \mu\text{M}$.

tracie van 5 μ M.
De waarden van ED₅₀ (de 50% antiviraal werkzame dosis) en van TD₅₀ (de 50% cytotoxische dosis) voor de testverbindingen zijn weergegeven in Tabel 1. Tevens vindt men daarvan de waarden van de selectiviteitsindex (SI), dat wil zeggen de verhouding van TD₅₀ tot ED₅₀ weergegeven.

Tabel 1

SI	Verbindung	ED50 (µM)	TD50 (µM)	SI	
				>100	<0,08
35	ddAdo	2,5	>250		
	ddeAdo	>125	9,5		
	ddThd	0,20	>125	>625	
	ddeThd	0,010	1,2	120	
	ddCyd	0,046	9,1		198
	ddeCyd	0,13	7,9		61
	ddUrd	48	>230		>5,2
	ddeUrd	>125	27	<0,22	
88240645				00891492	

Uit Tabel 1 blijkt dat ddRhD de hoogste selectiviteitsindex vertoonde. Deze verbinding was niet giftig bij concentraties van maximaal 125 µM. Daarop volgden de stoffen ddErRhD, ddCyD en ddCyD, die echter betrekkelijk giftig waren, alsmede ddAdo en ddUrd, waar de ED₅₀ betrekkelijk laag was. De resterende stoffen ddAdo en ddUrd hadden een negatieve waarde voor de selectiviteitsindex.

Voorbeeld 2

MESSAGE.

Dezelfde verbindingen als in Voorbeeld 1 werden ook met elkaar vergeleken, wat betreft hun remmende werking op de expressie van virusantigenen in met HIV geïnfecteerde MT-4 cellen. Dit effect werd bepaald door indirecte immunofluorescentie en laserstroom cytofluorografie, waarbij polyklonale antilichamen van een AIDS-patiënt als sonde werden gebruikt.

De resultaten zijn weergegeven in fig. 2 van de tekening, waarin het percentage fluorescente cellen (dat wil zeggen het percentage antigen-positieve cellen) is uitgezet tegen de concentratie van de testverbindingen. De gebruikte symbolen hebben de volgende betekenis:

●	ddAdo	○	ddeAdo
★	ddRhD	☆	ddeRhD
■	ddCyD	□	ddeCyD
▲	ddUrD	△	ddeUrD

Het gemiddelde percentage aan fluorescente cellen in afwezigheid van enige testverbinding (positieve controle) was $60 + 5\%$, terwijl het gemiddelde percentage fluorescente cellen in de quasi-geïnfecteerde cellen (negatieve controle)

1,0% was. Uit fig. 2 blijkt dat de stof ddeThd een volledige remming van de virusantigen-expressie veroorzaakte bij een concentratie van 0,04 uM. Deze concentratie was gelijk aan die welke benodigd was voor volledige bescherming tegen de cytopathogene werking van HIV. Op dezelfde wijze onderdrukte ddCyd de expressie van het virusantigen volledig bij 0,2 uM

88240645
1493
27000000

C O N C L U S I E S

bij welke concentratie het ook een volledige bescherming tegen de cytopathogene werking van het virus leverde. Als regel bestond een duidelijke correlatie tussen de remmende werking van de verbindingen op de HIV-antigenproductie en de remmende werking op het cytopathogene effect van HIV.

1. Therapeutisch middel ten gebruik bij de behandeling van AIDS en verwante ziektes, welk middel 2',3'-dideoxythymidine of 2',3'-dideoxythymidine als werkzaam bestanddeel bevat.
2. Werkwijze voor het behandelen van AIDS en verwante ziekten, gekenmerkt doordat men 2',3'-dideoxythymidine of 2',3'-dideoxythymidine toedient aan een patiënt die aan AIDS of een verwante ziekte lijdt.
3. Toepassing van 2',3'-dideoxythymidine of 2',3'-dideoxythymidine voor het bereiden van een therapeutisch middel met werking tegen AIDS en verwante ziekten.

* * * * *

88240645

8700089
1495

88240645

1494

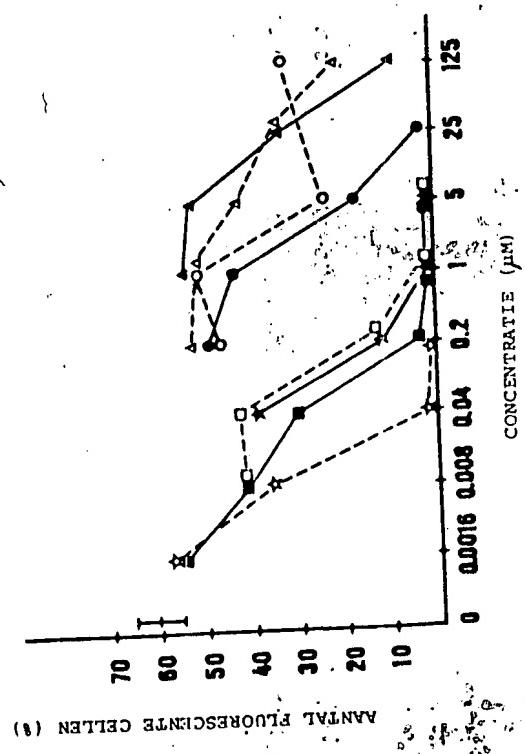


FIG. 2

88240645

1497

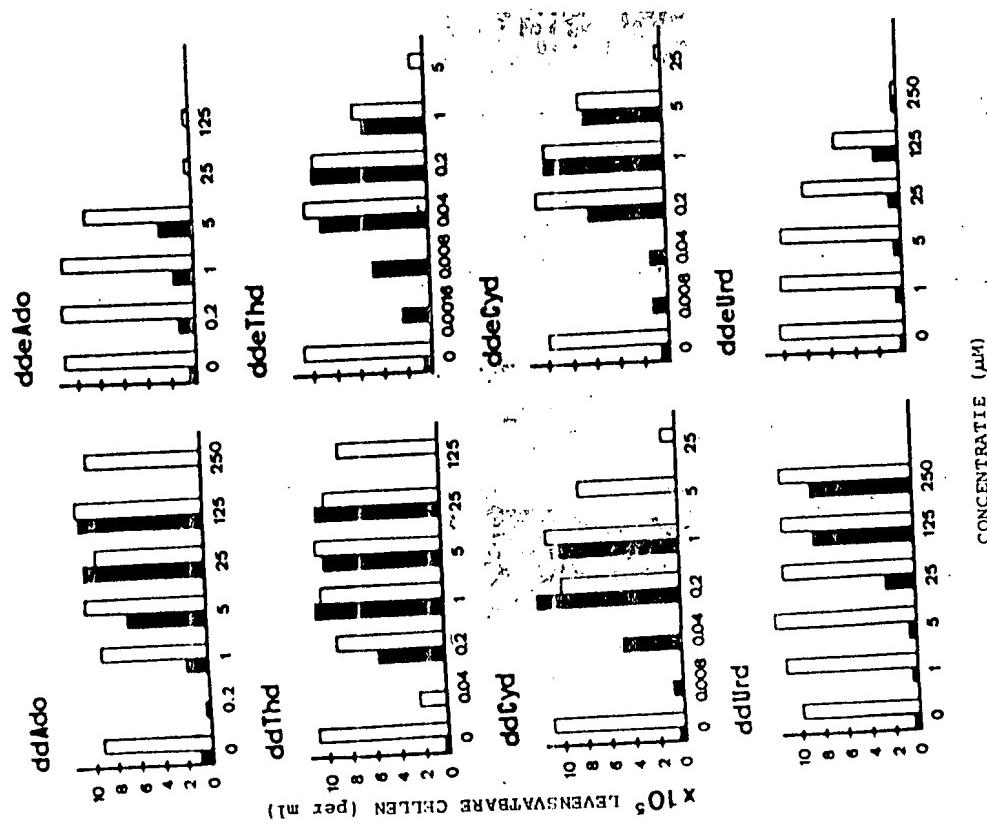


Fig. 1

1496

88240645